

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4



REC'D	18 FEB 2000
WIPO	PCT

IE P 99 / 9 7 4 4

# **Bescheinigung**

Herr Dr. Steffen P a n z n e r in Trebitz b Kloschwitz b Halle, Saale/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Strukturen in Form von Hohlkugeln"

am 17. November 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole B 01 J und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Januar 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Zeichen: 198 52 928.7

Brand

## Strukturen in Form von Hohlkugeln

Die Erfindung betrifft Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe zwischen 50 nm und 10  $\mu$ m Durchmesser, die insbesondere als Container für biologisch wirksame Stoffe eingesetzt werden. Diese Strukturen werden auch als Nanokapseln bezeichnet.

Nanokapseln oder Nanokugeln sind partikuläre Strukturen im Größenbereich zwischen 50 nm und 10  $\mu$ m, bei denen eine Hüllschicht einen Binnenraum vom Außenmedium abgrenzt. Diese Eigenschaft unterscheidet Nanokapseln von Nanosphären; die letzteren besitzen einen einheitlichen Querschnitt. Strukturen mit gleichem Aufbau sind auch in größeren Dimensionen bekannt und werden dann als Mikrokapseln bezeichnet. Liposomen und Viruskapside sind weitere verwandte Strukturen der Nanokapseln.

Zur Herstellung von Nanokapseln lassen sich vorteilhaft Verfahren einsetzen, bei denen Vernetzungsreaktionen an Phasengrenzflächen ausgeführt werden. Der mögliche Nutzen solcher Partikel ist maßgeblich von der verwendeten Hüllschicht und dem Herstellungsverfahren abhängig. Bekannte Hüllschichten nach dem Stand der Technik sind solche aus vernetzten Proteinen oder Grenzflächenpolymerisate, insbesondere aus Derivaten der Acrylsäure.

Hüllschichten aus Proteinen sind von besonderem Interesse, da sie biokompatibel und vollständig abbaubar sind. Die zum Aufbau verwendeten Proteine sind strukturbildend, können aber auch aktivitätstragend sein. Die Partikel sind zum Einschluß von Fremdstoffen sowie zur Bindung von anderen Komponenten an die Oberfläche geeignet. Aufgrund der natürlichen Vielfalt der einsetzbaren Proteine sind die Oberflächeneigenschaften in hohem Maße variabel und können unterschiedlichen Anforderungen angepaßt werden.

Membranen aus Surface-layer (S-layer)-Proteinen wurden (im EP 0154 620) beschrieben. Diese Membranen entstehen durch Rekristallisation der S-layer-Proteine in freier Lösung oder an der Oberfläche von Liposomen.

Im letzteren Fall ist der vorherige Einschluß von Makromolekülen möglich, die Liposomen werden durch das Aufbringen der Membran wesentlich stabilisiert (Kupcu, S., Sara, M. und Sleytr, U.B., Biochim. Biophys. Acta, 1235 (2): 263-269 (1995)). Bei flächig-kristallinem Aufbau der Membranen ergeben sich Strukturen mit einer regelmäßigen Anordnung von gleichartigen Poren, die vorteilhaft bei der Ultrafiltration verwendet werden können.

Die ebenfalls regelmäßige Anordnung chemischer Gruppen auf der Oberfläche führt bei der Bindung von anderen Makromolekülen zu einer sehr homogenen Verteilung, die vorteilhaft bei der Anwendung in Detektionssystemen ist. Limitierend für den Einsatz in biologischen Systemen kann sich bei den Membranen der S-layer-Proteinen deren Immunogenität auswirken. S-layer-Proteine erzeugen eine starke Immunantwort und werden daher als Adjuvans verwendet (US 5 043 158). Zudem sind die S-layer-Proteine nicht selbst aktivitätstragend.

Andere proteinhaltige Membranen werden (im US 5 498 421) beschrieben. Die Herstellungsmethode geht von zwei nichtmischbaren Phasen (flüssig/flüssig, fest/flüssig oder gasförmig/flüssig) aus, bei denen die äußere, hüllbildende Phase ein strukturbildendes Protein enthält. Dieses Protein (zum Beispiel Albumin oder Hämoglobin) lagert sich an der Phasengrenzfläche an und wird dort durch Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken unter Einwirkung von Ultraschall vernetzt. Aus Hämoglobin hergestellte Partikel sind zur Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff fähig, allerdings mit anderem Hill-Koeffizienten als natürliches Hämoglobin. Sie lassen sich als Blutersatz verwenden.

In anderen Verwendungen werden Gase oder Kontrastmittel in die Partikel eingeschlossen und bei bildgebenden Verfahren in der Medizin eingesetzt. In wieder anderen Verwendungen wird die Verpackung biologisch wirksamer Substanzen

beschrieben, insofern diese ohne Verlust ihrer Aktivität in der inneren öligen Phase gelöst werden können. Für eine Verpackung von hydrophilen Makromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren ist das Verfahren daher nur bedingt geeignet.

Liposomen werden unter anderem als Detektionssysteme mit hoher Signalverstärkung verwendet (US 4 622 294). Die Signalverstärkung wird in diesem Fall durch die hohe Anzahl von eingeschlossenen Enzymmolekülen im Verhältnis zu detektierten Spezies erreicht. Nachteilig bei der Verwendung von konventionellen Liposomen ist deren Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien, die bei verwandten Anwendungen zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen eingesetzt werden.

Die bekannten Strukturen haben folgende Nachteile:

Hohlkugeln mit einer permeablen Membran sind zum Einschluß von Makromolekülen geeignet, etwa bei pharmazeutischen Formulierungen. Dabei sind die Eigenschaften der umgebenden Membran und der Herstellungsprozeß wichtig für die spätere Verwendung.

In Verfahren, die auf der Verwendung von S-layern beruhen, entstehen Hohlkugeln mit einem wäßrigen Binnenraum und definierter Permeabilität der Hüllschicht. Die Möglichkeit zur Verpackung hydrophiler Makromoleküle ist gegeben. Nachteilig ist aber die Beschränkung der nutzbaren Verbindungen auf die S-layer-Proteine. Diese sind nicht aktivitätstragend und zeigen antigene Wirkung. Beim Verfahren nach US 5 498 421 entsteht eine funktionelle Hüllschicht aus Proteinen in einer Phasengrenze. Das System ist nur bedingt für den Einschluß von hydrophilen Makromolekülen geeignet.

Neuartige Membranen sollen diese Nachteile beseitigen.

Erfindungsgemäß gelingt dies durch Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe zwischen 50 nm und 10 µm Durchmesser, die durch kovalente Vernetzung von zwei verschiedenen wasserlöslichen Polymeren (P1 und P2), die eine größere Anzahl funktioneller Gruppen aufweisen, auf der Oberfläche von Liposomen hergestellt wurden.

Als Ausgangsmaterial werden Liposomen verwendet, deren Größe die der entstehenden Nanokapseln bestimmt. Geeignete Methoden zur Herstellung solcher Liposomen sind an sich bekannt, vorzugsweise werden uni- und oligolamellare Liposomen aus einer Mischmicellenlösung durch Detergendsialyse oder Gelfiltration hergestellt. Eine andere vorteilhafte Variante der Herstellung von Liposomen umfaßt die Auflösung der Lipidbestandteile in Ethanol und die Mischung der Lösung mit Wasser oder wässrigen Pufferlösungen. Aus den so gewonnenen multilamellaren Liposomen werden durch Extrusion im Hochdruckhomogenisator (French Press) kleinere uni- oder oligolamellare Vesikel mit enger Größenverteilung hergestellt. Eine Variation dieser Technik ist die Passage der multilamellaren Ausgangsliposomen durch isopore Membranen, die ebenfalls zur Entstehung von uni- und oligolamellaren Liposomen mit enger Größenverteilung führt.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Strukturen in Form von Hohlkugeln, bei denen die Liposomen nach der Vernetzung aufgelöst wurden.

Alle verwendeten Liposomen müssen die Bindung des wasserlöslichen Polymers P1 ermöglichen. Methoden für die kovalente Kopplung in wässrigen Medien sind dem Fachmann bekannt und beinhalten die Verknüpfung von Amino-, Thiol-, Hydrazo- und/oder Aldehydgruppen oder Carboxylgruppen oder deren aktivierte Ester in geeigneten Kombinationen.

Verknüpfungen zwischen Aminogruppen und anderen Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppen werden vorteilhaft unter Zuhilfenahme von Hilfsstoffen ausgeführt. Dazu sind die in der Proteinchemie gebräuchlichen bifunktionellen Quervernetzer geeignet, wie etwa Glutardialdehyd, bifunktionelle Imidoester oder Maleimide,

Carbodiimide und andere sowie Stoffe, die Maleimid-, Pyridithiol-, p-Nitrophenyl-, Azido-, N-Hydroxysuccinimid- oder Haloacetylgruppen enthalten. Eine gebräuchliche Variante der Kopplung zwischen Amino- und Carboxylgruppen beinhaltet die Derivatisierung des Carboxyls in einen reaktiven Ester, etwa unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimid. Diese Derivatisierung kann am Polymer oder am Liposom erfolgen.

Für eine nichtkovalente Kopplung sind chelatisierende Lipide geeignet. Ist das Polymer P1 ein Polymer mit hinreichender Affinität zur Lipidschicht, so ist kein distinkter Kopplungsschritt notwendig. Eine elektrostatische Aufkonzentrierung von P1 an der Lipidschicht ist vorteilhaft für die Ausführung des Kopplungsschritts.

Ein nach der Bindung eventuell vorhandener starker Überschuß an Polymer P1 wurde durch geeignete Maßnahmen wie etwa Flotation, Gelfiltration oder Ultrafiltration entfernt.

In einem folgenden Schritt wurde das Polymer P1 durch ein davon verschiedenes Polymer P2 kovalent vernetzt. Die dafür eingesetzten Hilfsstoffe und Verfahren entsprechen denen für die kovalente Fixierung von P1. Die Verwendung von Hilfsstoffen entfällt, wenn P1 und P2 von sich aus kovalente Verbindungen eingehen können. Das ist etwa der Fall, wenn P1 oder P2 ein polyfunktionelles Aldehyd und der andere Partner ein polyfunktionelles Amin oder Hydrazin sind.

Sowohl P1 als auch P2 sind wasserlösliche Polymere, die eine größere Anzahl funktioneller Gruppen wie Amino-, Thiol-, Carboxyl-, oder Hydrazo- und/oder Aldehydgruppen besitzen.

Dazu gehören insbesondere Polysaccharide wie Alginsäure und Chitosan, aber auch Pektin, Hyaluronsäure sowie carboxylierte, hydrazylierte oder oxidierte Dextrane. Dazu gehören auch das Polymerisationsprodukt des Glutaraldehyds und andere polyfunktionelle Aldehyde. Dazu gehören weiterhin natürliche oder synthetische

Proteine oder Homo- oder Heteropolymere aus Aminosäuren, die über mehrere freie Amino-, Carboxyl- oder Thiolgruppen verfügen.

Es gehören weiterhin dazu Mischformen der aufgeführten Verbindungen wie glykosylierte Proteine, posttranslational modifizierte Proteine, Proteinkomplexe mit anderen Naturstoffen, Kopolymere aus Zuckern und Acrylaten und verwandte Verbindungen, insofern als alle diese Verbindungen wasserlöslich sein müssen und nicht selbst micellare oder vesikuläre Strukturen bilden.

Ein wichtiger Anwendungsfall besteht darin, daß ein Polymer ein Protein ist.

Vorzugsvarianten sind solche, bei denen dieses Protein ein Albumin, ein Hämoglobin, ein Antikörper, Protein A, Protein G, Avidin, Streptavidin, Concanavalin A oder Wheat Germ Agglutinin ist.

Vorteilhaft ist es, wenn eines der Polymeren P1 oder P2 eine fädige Struktur aufweist. Das ist bei vielen Kohlenhydraten der Fall oder bei Polymeren der Acrylsäure oder ihrer Derivate.

Das Polymer kann auch fluoreszierende Eigenschaften haben oder diese durch Modifizierungen erhalten. Ein geeigneter Stoff mit solchen Eigenschaften ist das Green Fluorescent Protein. Andere Proteine oder Kohlenhydrate lassen sich mit fluoreszierenden Stoffen modifizieren. Geeignete Methoden dazu sind dem Fachmann an sich bekannt und beinhalten die kovalente Bindung des aktivierten Fluorophors an entsprechende Gruppen des Polymers.

Freie Nukleinsäuren gehören nicht zu den geeigneten Polymeren.

Da das Polymer P1 an der Oberfläche der Liposomen eine lokal weit höhere Konzentration als in freier Lösung aufweist, geht die Vernetzung vorzugsweise an der Oberfläche vonstatten. Reste von P1 in freier Lösung können mit dem Polymer P2 ebenfalls vernetzt werden und Partikel bilden. Freies P2 und freie P1-P2-Partikel

lassen sich von den beschichteten Liposomen durch Flotation, Gelfiltration oder Ultrafiltration abtrennen.

Nach Beschichtung und Vernetzung erhält man Hohlkugeln, bei denen eine innere Lipidmembran mit einer äußeren polymeren Hülle umgeben ist. Diese Hülle verändert die Oberflächeneigenschaften der Liposomen und erhöht deren Stabilität.

In einer Vorzugsvariante wird die formgebende Lipidschicht unter Verwendung von Detergenzien ausgewaschen. Dabei kommt es auch zur Freisetzung von solchen Polymeren P1 oder P2, die lediglich an der Lipidschicht, nicht aber untereinander gebunden sind, sowie zum Zerfall nicht hinreichend vernetzter Strukturen. Die Nanokapseln lassen sich von diesen Zerfallsprodukten durch Sedimentation, Gelfiltration oder Ultrafiltration abtrennen. Geeignete Detergenzien sind alkylierte Zucker wie etwa Octylglucosid, Salze der Cholsäure und ihrer Derivate, Alkylsulfonsäuren oder Polyoxyethylenderivate.

Hohlkugeln im Nanometerbereich im Sinne dieser Erfindung bestehen essentiell aus den beiden Polymeren P1 und P2. Die formgebenden Liposomen können erhalten bleiben oder entfernt werden, bestimmen aber nicht die Stabilität oder die Oberflächeneigenschaften der erhaltenen Struktur. Die Größe der entstandenen Hohlkugeln wird durch die der eingangs verwendeten Liposomen bestimmt.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Hohlkugeln sind zum Einschluß von biologisch wirksamen Stoffen, beispielsweise von pharmazeutischen Wirkstoffen, geeignet.

In diesem Fall werden Liposomen verwendet, welche die einzuschließenden Stoffe bereits enthalten. Methoden zur Herstellung solcher Liposomen sind dem Fachmann bekannt. Die verwendbaren Stoffe sind lediglich insofern eingeschränkt als sie die Integrität der Liposomen nicht nachteilig beeinflussen dürfen, wie etwa Detergenzien.



Geeignete Stoffe sind Proteine, Peptide, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren sowie Gemische derselben.

Zu den geeigneten Stoffen gehören weiterhin Antibiotika und antivirale Agenzien, Antikörper, Zytostatika und Immunsuppressiva.

Nicht geeignet sind solche Stoffe, die sich in die Lipidschicht der Liposomen einlagern und die beim Aufbau des Polymernetzwerks inaktiviert werden.

Die Permeabilität der Hüllschicht der Hohlkugeln wird durch das Auswaschen der Liposomen wesentlich erhöht. Dieser Prozeß beinhaltet die Passage von Detergensmolekülen und Mischmicellen durch die äußere Hüllschicht. In gleicher Weise können Substrate und Produkte einer im Inneren der Hohlkugel stattfindenden Reaktion ausgetauscht werden. Eine Anordnung zur Durchführung solcher Reaktionen besteht vorzugsweise aus Hohlkugeln mit im Inneren befindlichen enzymatisch aktiven Stoffen mit hohem Molekulargewicht, deren Liposomen durch Detergenzien ausgewaschen wurden. Geeignete Stoffe für einen solchen Einschluß sind insbesondere Enzyme oder Ribozyme.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden solche Polymere zum Aufbau der Hüllschicht verwendet, die nicht nur strukturbildend, sondern auch aktivitätstragend sind. Solche Hüllen können zum Beispiel Bindungseigenschaften für andere Moleküle besitzen. Unter den Proteinen finden sich solche Polymere mit strukturbildenden und aktivitätstragenden Eigenschaften.

In einer besonderen ökonomischen Variante dieser Ausgestaltung wird die Hüllschicht unter Verwendung von solchen Proteinen hergestellt, die häufig vorkommende Merkmale anderer Proteine erkennen und binden können. Geeignete Proteine für diesen Zweck sind Lektine, biotinbindende oder antikörperbindende Proteine. Die eigentliche Spezifität wird durch die nachträgliche Dotierung mit anderen, hochspezifischen Proteinen erreicht.

Zu den hochspezifischen Molekülen gehören insbesondere solche, die mit der Oberfläche von Zellen interagieren können. Komplementäre Paare in diesem Sinne sind Antikörper, membranständige Antigene, Lektine und membranständige Glykosylierungen, Hormone und deren Rezeptoren und andere mehr.

Vorteilhaft ist der modulare Aufbau dieser Strukturen, der zum einen die Erzeugung einer offenen Anzahl von Spezifitäten auf einigen wenigen Hüllschichten erlaubt, zum anderen einen sehr ökonomischen Einsatz der letztlich spezifitätsbestimmenden Komponenten gestattet. Darüber hinaus kommen diese Komponenten nicht mit den zur Vernetzung verwendeten Chemikalien in Kontakt, die Gefahr einer Inaktivierung ist daher nicht gegeben. Die Valenz der erhaltenen Struktur, das heißt die Anzahl der oberflächlich gebundenen spezifischen Komponenten läßt sich leicht durch Titration verändern. Eine hohe Dichte dieser Komponenten ist gleichbedeutend mit einer hohen Avidität und ermöglicht stabile Interaktionen auch bei ungünstigen Bindungskonstanten der einzelnen Wechselwirkung, wie sie etwa zwischen MHC-Komplexen und T-Zell-Rezeptoren gegeben ist.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe von 50 nm und 10  $\mu$ m Durchmesser erfolgt dadurch, daß

- eine Matrix aus Liposomen hergestellt wird,
- diese Liposomen mit einem Polymeren P1 mit seiner größeren Anzahl funktioneller Gruppen beschichtet werden und
- das aufgebrachte Polymer P1 mit einem anderen Polymeren P2, das ebenfalls eine größere Anzahl funktioneller Gruppen hat, in wäßriger Lösung vernetzt wird.

Eine Variante besteht darin, daß zur Herstellung von Strukturen in Form von Hohlkugeln die Liposomen nach Aufbringen des Polymer P1 und Vernetzung mit dem Polymeren P2 mit einem Detergenz ausgewaschen werden,

Um die wirksamen Verbindungen in die Hohlkugel zu bringen, geht man bei der Herstellung der Hohlkugel von Liposomen aus, in die biologisch wirksame Stoffe

eingeschlossen sind, die bei den weiteren Reaktionsschritten in der Hohlkugel verbleiben.

Figur 1 zeigt ein Schema zur Herstellung von Strukturen in Form von Hohlkugeln:

Liposomen (1) werden zunächst mit dem Polymer P1 beschichtet (2). Anschließend wird diese Schicht durch ein anderes Polymer P2 vernetzt (3). Die formgebenden Liposomen können durch Detergenzien entfernt werden (4).

Die Verwendung der Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe zwischen 50 nm und 10  $\mu\text{m}$  erfolgt vor allem als Container für biologisch wirksame Stoffe.

In einer bevorzugten Verwendung kommen insbesondere solche Stoffe mit enzymatischer Aktivität zum Einsatz, deren Substrate und Produkte durch die Hüllschicht ausgetauscht werden können.

Nanokapseln im Sinne der vorliegenden Erfindung besitzen eine diffusionsoffene Struktur, die den Austausch von Molekülen mit signifikanter Größe, etwa beim Herauslösen der Lipidschicht, zulässt. Große Moleküle wie etwa Enzyme werden jedoch von der Hüllschicht zurückgehalten. In weiteren erfindungsgemäßen Verwendungen der Nanokapseln sind diese mit solchen Enzymen gefüllt, die Reaktionen katalysieren, deren Substrate und Produkte die Hüllschicht passieren können. Diese Art der Verpackung eines biologischen Makromoleküls in Nanokapseln hat gegenüber dem Stand der Technik den Vorteil extrem geringer Diffusionswege und einer damit verbundenen Erhöhung der spezifischen Aktivität des eingeschlossenen Enzyms. Darüber hinaus kann die Einwirkung von vernetzenden Agenzien, wie sie bei der chemischen Fixierung auftritt, vermieden werden.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Verwendung werden signalgebende Systeme, wie etwa Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase oder fluorescenzmarkierte Makromoleküle, in solche Nanokapseln eingeschlossen, die spezifische Bindungseigenschaften gegenüber anderen Stoffen aufweisen. Solche Systeme sind

zur Detektion dieser anderen Stoffe geeignet, insbesondere in der medizinischen oder biochemischen Diagnostik. Vorteilhaft gegenüber den Liposomen ist die Tatsache, daß Nanokapseln stabil gegenüber Detergenzien sind, insbesondere auch gegenüber solchen Detergenzien, die zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen in solchen Verfahren eingesetzt werden, wie etwa Tween 20 oder Triton X-100.

In einer Variante dieser erfindungsgemäßen Verwendung sind die Nanokapseln selbst Träger des signalgebenden Systems. Vorteilhaft werden Nanokapseln präpariert, deren Polymere fluoreszierende Eigenschaften besitzen. Dabei werden fluoreszierende Derivate von P1 und/oder P2 zum Aufbau der Nanokapseln verwendet oder die Nanokapseln nach ihrer Herstellung mit fluoreszierenden Stoffen kovalent verbunden.

Die hier beschriebenen Strukturen sind als Träger für pharmazeutische Wirkstoffe im Sinne des drug delivery oder für Detektionssysteme geeignet. Bei der Verwendung in Detektionssystemen ist die Stabilität der Struktur gegenüber Detergenzien von wesentlichem Vorteil, da solche Stoffe üblicherweise zur Unterdrückung unspezifischer Interaktionen eingesetzt werden.

In einer erfindungsgemäßen Verwendung der Nanokapseln sind diese so beschaffen, daß sie spezifisch an Zielzellen von Säugetieren binden. Nanokapseln im Sinne dieser Verwendung besitzen eine oder mehrere Klassen von Liganden auf ihrer Oberfläche, deren komplementäre Bindungspartner sich auf der Oberfläche der Zielzellen befinden. Nanokapseln mit solchen Eigenschaften sind Träger für Therapeutika, die diese an einen definierten Wirkort dirigieren. Die innere Lipidschicht der Hohlkugeln kann bei dieser Verwendung erhalten bleiben, wenn es dem Einschluß der zu transportierenden Substanz dienlich ist.

In einer Variante dieser erfindungsgemäßen Verwendung enthalten die Nanokapseln Stoffe, gegen die eine Immunantwort ausgelöst werden soll.

Nanokapseln gemäß der hier vorliegenden Erfindung sind hydrophile, permeable und detergensstabile Strukturen aus vernetzten Polymeren, die sich aufgrund der Vielzahl von verwendbaren Komponenten für eine große Zahl von Anwendungen spezifizieren lassen. Die vorliegende Erfindung erweitert erheblich das Spektrum solcher Stoffe, die sich als Trägermaterialien im Sinne eines drug targeting verwenden lassen. Dabei können die verwendeten Komponenten sowohl strukturbildend als auch aktivitätstragend sein. Die beschriebenen Hohlkugeln lassen sich aus Stoffen mit einer antigenen Wirkung herstellen oder aus solchen, die keine Immunantwort hervorrufen.

Benutzt man die hier beschriebene Struktur zum Einschluß von Enzymen, so ist durch die diffusionsoffene Architektur eine hohe Verfügbarkeit der eingeschlossenen Aktivität gewährleistet. Bei der gewählten Größe im Mikrometer- und Submikrometerbereich sind die Diffusionswege zudem extrem kurz. Während der Präparation der Hüllen sind die eingeschlossenen Stoffe vor der Aktion chemischer Quervernetzer geschützt, es kann damit nicht zu einer Inaktivierung durch diese Chemikalien kommen. Der hier formulierte Einschluß von Makromolekülen ist daher der denkbar schonendste.

## Beispiele

### 1. Herstellung von BSA(Rinderserumalbumin)-Alginate Nanokapseln

#### Herstellung von Liposomen

Die als Matrix verwendeten Liposomen werden durch Dialyse eines Gemisches aus Phosphatidylcholin (PC, 47,5 mol%), Phosphatidylserin (PS; 2,5 mol%) und Natriumdeoxycholat (50 mol%) hergestellt. Das Gemisch wird gegen 150 mM Natriumchlorid in Wasser dialysiert.

#### Beschichtung mit P1

Zur Beschichtung mit BSA stellt man folgende Endkonzentrationen ein: Lipid 4 mg/ml, BSA 10 mg/ml, EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimid) 10 mg/ml und MES (Morpholinoethansulfonsäure) 50 mM pH 5.1. Die Fixierung des BSA auf der

Oberfläche der Liposomen erfolgt für mindestens eine Stunde bei 37 °C, anschließend beendet man die Reaktion durch Zugabe von 200 mM Kaliumacetat. Der Überschuß des eingesetzten BSA und EDC wird durch Flotation abgetrennt. Dazu wird die Reaktionsmischung auf 1 M Sucrose eingestellt und im Zentrifugenröhrchen mit einer Lösung von 0,5 M Sucrose in 20 mM Natriumphosphat pH 7.4 und 150 mM NaCl überschichtet. Über diese Schicht gibt man eine Lösung von 20 mM Natriumphosphat pH 7.4 in 150 mM NaCl.

Die Flotation erfolgt in einer Ultrazentrifuge, z.B. mit dem Rotor TLA 100.4 (Fa. Beckman) bei 100.000 rpm für 30 min bei 20 °C. Die beschichteten Liposomen sammeln sich an der Grenze zwischen den beiden oberen Schichten und werden von dort abgenommen. Alternativ ist eine Abtrennung durch Gelfiltration möglich.

### **Vernetzung mit P2**

Zur Vernetzung der P1-Schicht werden den beschichteten Liposomen 200 µg/ml Natriumalginat und 50 mM MES-Puffer pH 5.1 zugesetzt. Die Viskosität einer 2%igen Lösung des verwendeten Alginats beträgt 3500 cps. Die Vernetzung wird durch Zugabe von 10 mg/ml EDC gestartet und für zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion stoppt man anschließend wie oben durch Zugabe von 200 mM Kaliumacetat.

### **Auswaschen der Liposomen**

Zur Entfernung der zentralen Liposomen und des nicht vernetzten Materials gibt man CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonsäure) bis zu einer Endkonzentration von 1 % zu. Die so erhaltenen detergensstabilen Strukturen, deren Größe dem Ausgangsmaterial entspricht, sind Nanokapseln im Sinne dieser Erfindung. Die Effizienz der Kapselbildung wird durch Messung der Lichtstreuung vor und nach der Gabe von Detergens bestimmt. 30 bis 60 % der ursprünglichen Lichtstreuintensität bleiben erhalten.

## **2. Herstellung von Nanokapseln aus Concanavalin A und Alginat**

### **Herstellung der Liposomen**

820 mg Phosphatidylcholin wurden in 1 ml Ethanol und 42 mg Phosphatidylserin und 490 mg Natriumdeoxychololat in 2,5 ml Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 40 ml aufgefüllt. Liposomen wurden daraus

durch Gelfiltration (Sephadex G25) in 0,9%iger NaCl-Lösung erhalten. Die benutzte Säule hatte eine Dimension von  $2,5 \times 25 \text{ cm}^2$ , je 10 ml der obigen Lösung wurden aufgetragen und mit einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Die erhaltene Liposomenlösung wurde mit konzentrierten Lösungen auf 1 M Sucrose, 100 mM Morpholinoethansulfonsäure (MES) pH 5.1 und 200 mM NaCl eingestellt, mit einer Lösung von 100 mM MES pH 5.1 und 200 mM NaCl überschichtet, und mittels Flotation in einer Ultrazentrifuge aufkonzentriert (Rotor Beckmann SW 28, 28.000 rpm für 2 h). Das Konzentrat wurde mild mit Ultraschall behandelt (BRANSON Sonifier, ca. 10 W Ausgangsleistung in 30 Pulsen a 1 s) und durch ein Filter mit einer Porenweite von  $0,22 \mu\text{m}$  gedrückt.

### **Beschichtung mit P1**

5 ml des filtrierten Konzentrats wurden mit 1 ml MES-Puffer (500 mM pH 5.0) und  $300 \mu\text{l}$  NaCl-Lösung (5 M) versetzt, anschließend wurden 35 mg Concanavalin A (Fa. SIGMA Type VI) und 75 mg EDC zugegeben und die Mischung für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Lösung wurden dann 2 ml HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) (1 M pH 8.0) und  $200 \mu\text{l}$  Kaliumacetatlösung (5 M) zugesetzt, nach weiteren 10 min wurden 7 ml Sucroslösung (2,5 M) zugegeben. 3 ml der Lösung wurden in Ultrazentrifugationsröhrchen mit 1,5 ml einer Lösung (0,8 M Sucrose, 100 mM MES pH 5,0, 200 mM NaCl) und 0,5 ml eines MES-Puffers (100 mM pH 5.0, 200 mM NaCl) überschichtet und für 30 min bei 55.000 rpm (Beckman SW 55) zentrifugiert. Die flotierten Liposomen wurden gesammelt und mit 100 mM MES pH 5.0 auf 5 ml aufgefüllt.

### **Vernetzung mit P2**

2,5 ml dieser Lösung wurden mit  $100 \mu\text{l}$  einer Alginatlösung (10 mg/ml Natriumalginat Viskosität der 2%igen Alginatlösung ist 3500 cps) und 50 mg EDC versetzt. MES-Puffer pH 5,0 und NaCl-Lösung wurden zugegeben, um eine Endkonzentration von 100 mM (MES) bzw. 200 mM (NaCl) zu erreichen; die Lösung wurde auf 4 ml mit Wasser ergänzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Abschluß der Reaktion wurden 1 ml HEPES (1 M pH 8.0) und  $200 \mu\text{l}$  Kaliumacetat (5 M) sowie je  $5 \mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MnCl}_2$  (je 1 M) zugesetzt.

### **Auswaschen der Liposomen**

Nach 10 min wurden 250 µl einer Lösung von DeoxyBigCHAP (N,N-bis[3-Gluconamidopropyl]deoxycholamid) (10 % in Wasser) zugesetzt. In Ultrazentrifugationsröhrchen (SW 55, Beckman) wurde diese Lösung mit einer Sucroslösung mittlerer Dichte (0,5 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.5, 0,2 % DeoxyBigCHAP, 100 mM Kaliumacetat, je 1 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub>) sowie einer Sucroslösung hoher Dichte (2 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.5, 0,2 % DeoxyBigCHAP, 100 mM Kaliumacetat, je 1 mM CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub>) unterschichtet und für 1 h bei 55.000 rpm zentrifugiert. Die Nanokapseln sedimentieren und können an der Grenzfläche zwischen 0,5 M und 2 M Sucroslösung abgenommen werden. Die so erhaltenen Proben enthalten kein nachweisbares Lipid und 1 mg/ml Protein. Das Concanavalin A ist nach der Prozedur noch bindungsfähig und kann glykosylierte Proteine binden.

### **3. Herstellung von Nanokapseln mit Einschluß von Meerrettich Peroxidase**

Liposomen werden wie unter 2. durch Gelfiltration hergestellt, wobei der Ausgangslösung 1 mg/ml Meerrettich-Peroxidase zugesetzt werden. Überschüssiges Peroxidase wird bei der Flotation abgetrennt. 1,3 % der anfänglichen Enzymmenge und 25 % des eingesetzten Lipids fanden sich in der flotierten Phase. Die Beschichtung wurde wie unter 2. mit Concanavalin A vorgenommen.

100 µl der alginatbeschichteten, aber nicht mit DeoxyBigCHAP behandelten Probe wurden zur Analyse des Einschlusses verwendet. Dazu wurde die Probe mit 100 µl Detergenslösung (2 % DeoxyBigCHAP, 100 mM HEPES pH 7.5 und 150 mM Kaliumacetat) gemischt und in einem Ultrazentrifugationsröhrchen (0,8 ml für Beckman SW 55) mit 350 µl einer Sucroslösung mittlerer Dichte (0,8 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM Kaliumacetat und 0,2 % DeoxyBigCHAP) und 100 µl einer Sucroslösung hoher Dichte (2 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM Kaliumacetat und 0,2 % DeoxyBigCHAP)) unterschichtet und für 1 h bei 55.000 rpm zentrifugiert. Von der Phasengrenze zwischen 2 M und 0,8 M Sucrose wurden die Nanokapseln gesammelt, freigesetzte Proteine und zerfallende Hüllschichten wurden aus der obersten Probenauftragsschicht entnommen. Die Verteilung von Protein, Lipid und Peroxydase ist für unbeschichtete Liposomen und Nanokapseln in der Tabelle wiedergegeben.

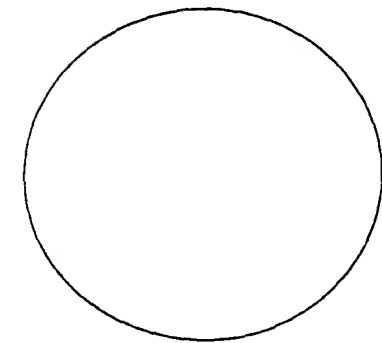


Nur nach Beschichtung der Liposomen mit Concanavalin A und Alginat findet sich ein signifikanter Anteil (etwa 25 %) der Peroxidase gemeinsam mit etwa 15 % des Proteins in der sedimentierten Phase.

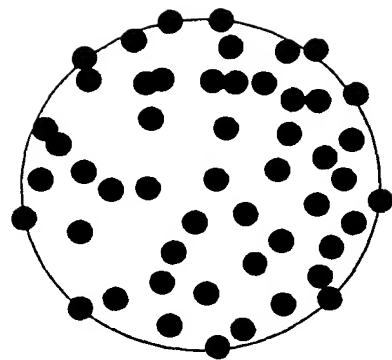
Probe	Lipid in $\mu\text{g}$	Protein in $\mu\text{g}$	POD in ng
Unbeschichtete Liposomen, obere Phase	1260	2500	835
Unbeschichtete Liposomen, untere Phasengrenze	0	85	1
Nanokapseln, obere Phase	570	1410	190
Nanokapseln, untere Phasengrenze	0	202	71

Die Zahlen geben den Gesamtgehalt der entsprechenden Fraktion an.

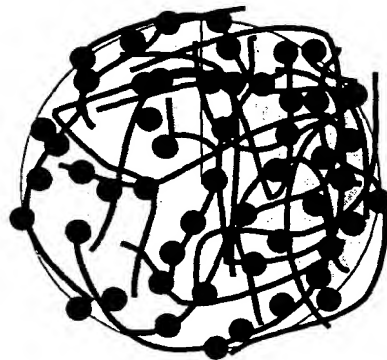
FIGUR 1 - Schema zur Herstellung von Strukturen in Form von Hohlkugeln



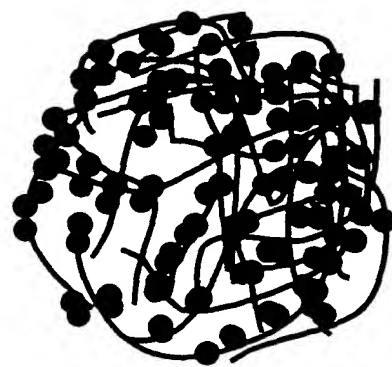
(1)



(2)



(3)



(4)

## Patentansprüche

1. Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe zwischen 50 nm und 10 µm Durchmesser, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch kovalente Vernetzung von zwei verschiedenen wasserlöslichen Polymeren (P1 und P2), die eine größere Anzahl funktioneller Gruppen aufweisen, auf der Oberfläche von Liposomen hergestellt wurden.
2. Strukturen in Form von Hohlkugeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen nach der Vernetzung aufgelöst wurden.
3. Strukturen in Form von Hohlkugeln nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserlöslichen Polymeren eine größere Anzahl Amino-, Thiol-, Hydrazo- und/oder Aldehydgruppen oder Carboxylgruppen oder deren aktivierte Ester enthalten und nicht selbst micellare oder vesikuläre Strukturen bilden.
4. Strukturen in Form von Hohlkugeln nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eines der Polymeren ein Protein ist.
5. Strukturen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein ein Albumin, ein Hämoglobin, ein Antikörper, Protein A, Protein G, Avidin, Streptavidin, Concanavalin A oder Wheat Germ Agglutinin ist.
6. Strukturen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eines der Polymere ein Kohlenhydrat ist.
7. Strukturen nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Kohlenhydrat eine Alginsäure oder ein Chitosan ist.
8. Strukturen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eines der Polymere ein Acrylat ist.

9. Strukturen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polymer fluoreszierende Eigenschaften hat.
10. Strukturen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Innenraum der Hohlkugel biologisch wirksame Stoffe eingeschlossen sind.
11. Strukturen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß diese Stoffe enzymatische Aktivität besitzen und Proteine sind.
12. Strukturen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Stoffe an der Oberfläche der Hohlkugeln gebunden sind, deren Anwesenheit jedoch nicht für den Erhalt der Hohlkugelstruktur erforderlich ist.
13. Verfahren zur Herstellung von Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe von 50 nm und 10 µm Durchmesser, dadurch gekennzeichnet, daß
  - eine Matrix aus Liposomen hergestellt wird,
  - diese Liposomen mit einem Polymeren P1 mit seiner größeren Anzahl funktioneller Gruppen beschichtet werden und
  - das aufgebrachte Polymer P1 mit einem anderen Polymeren P2, das ebenfalls eine größere Anzahl funktioneller Gruppen hat, in wäßriger Lösung vernetzt wird.
14. Verfahren zur Herstellung von Strukturen in Form von Hohlkugeln nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen nach Aufbringen des Polymeren P1 und Vernetzung mit dem Polymeren P2 mit einem Detergenz ausgewaschen werden.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der Herstellung der Hohlkugel von Liposomen ausgeht, in die biologisch wirksame Stoffe eingeschlossen sind, die bei den weiteren Reaktionsschritten in der Hohlkugel verbleiben.

16. Verwendung von Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe von 50 nm und 10 µm Durchmesser als Container für biologisch wirksame Stoffe.
17. Verwendung von Strukturen in Form von Hohlkugeln nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den Hohlkugeln Stoffe mit enzymatischer Aktivität eingeschlossen sind, deren Substrate und Produkte durch die Hüllschicht ausgetauscht werden können.
18. Verwendung von Strukturen nach Anspruch 16 zur biochemischen Diagnostik.
19. Verwendung von Strukturen nach Anspruch 16 zum Transport der biologisch wirksamen Stoffe an deren endogene Wirkorte bei pharmazeutischen Applikationen.

## Zusammenfassung

### Strukturen in Form von Hohlkugeln

Die Erfindung betrifft Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe zwischen 50 nm und 10  $\mu$ m Durchmesser, die insbesondere als Container für biologisch wirksame Stoffe eingesetzt werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Strukturen in Form von Hohlkugeln mit einer Größe von 50 nm und 10  $\mu$ m Durchmesser erfolgt dadurch, daß

- eine Matrix aus Liposomen hergestellt wird,
- diese Liposomen mit einem Polymeren P1 mit seiner größeren Anzahl funktioneller Gruppen beschichtet werden und
- das aufgebrachte Polymer P1 mit einem anderen Polymeren P2, das ebenfalls eine größere Anzahl funktioneller Gruppen hat, in wäßriger Lösung vernetzt wird.

Nanokapseln gemäß der hier vorliegenden Erfindung sind hydrophile, permeable und detergensstabile Strukturen aus vernetzten Polymeren, die sich aufgrund der Vielzahl von verwendbaren Komponenten für eine große Zahl von Anwendungen spezifizieren lassen.